

(51)

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

Int. Cl.:

C 07 c, 103/52

A 61 k, 27/00

DEUTSCHES PATENTAMT



(52)

Deutsche Kl.: 12 q, 6/01  
30 h, 2/36CITATION NO.: 75;  
SERIAL NO.: 10/737.144  
FILING DATE: 12/15/2003  
IDS FILING DATE: 03/23/2009  
INVENTOR: Yum, et al.  
DOCKET NO.: DURE-050

(10)

(11)

(21)

(22)

(43)

## Offenlegungsschrift 2 321 174

Aktenzeichen: P 23 21 174.7

Anmeldetag: 26. April 1973

Offenlegungstag: 8. November 1973

Ausstellungspriorität: —

(30)

Unionspriorität

(32)

Datum: 29. April 1972 24. November 1972

(33)

Land: Japan

(31)

Aktenzeichen: 42686-72 118452-72

(54)

Bezeichnung: Nonapeptidamidderivate und Verfahren zu ihrer Herstellung

(61)

Zusatz zu: —

(62)

Ausscheidung aus: —

(71)

Anmelder: Takeda Chemical Industries Ltd., Osaka (Japan)

Vertreter gem. § 16 PatG: Kreisler, A.v., Dr.-Ing.; Schönwald, K., Dr.-Ing.; Meyer, Th., Dr.-Ing.;  
Fues, J.F., Dipl.-Chem. Dr.rer. nat.; Kreisler, A.v., Dipl.-Chem.;  
Keller, C., Dipl.-Chem.; Klöpsch, G., Dr.-Ing.; Selting, G., Dipl.-Ing.;  
Pat.-Anwälte, 5000 Köln

(72)

Als Erfinder benannt: Fujino, Masahiko, Hyogo; Kobayashi, Shigeru; Obayashi, Mikihiro;  
Shinagawa, Susumu; Fukuda, Tsunehiko; Osaka (Japan)

Rechercheantrag gemäß § 28 a PatG ist gestellt

DT 2 321 174

PATENTANWÄLTE

DR.-ING. VON KREISLER DR.-ING. SCHÜNWALD  
DR.-ING. TH. MEYER DR. FUES DIPL.-CHEM. ALEK VON KREISLER  
DIPL.-CHEM. CAROLA KELLER DR.-ING. KLÖPSCH DIPL.-ING. SELTING

5 KÖLN 1, DEICHMANNHAUS

Köln, den 25. April 1973  
Kl/Ax

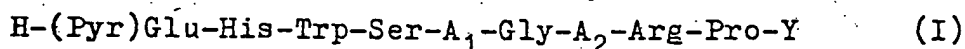
2321174

Takeda Chemical Industries, Ltd.,

27, Doshomachi 2-chome, Higashi-ku, Osaka (Japan).

Nonapeptidamidderivate und Verfahren zu ihrer Herstellung

Die Erfindung betrifft neue Nonapeptidamidderivate mit starker ovulationsfördernder Wirkung. Die neuen Nonapeptidamidderivate haben die allgemeine Formel



in der  $\text{A}_1$  für Tyr oder Phe,  $\text{A}_2$  für Leu, Ile, NLe, Val, NVal, Met oder Phe, Y für NHR, worin R ein gegebenenfalls mit einer Hydroxylgruppe substituierter geradkettiger oder verzweigter Alkylrest mit 1 bis 3 C-Atomen ist, oder für eine Pyrrolidinogruppe steht.

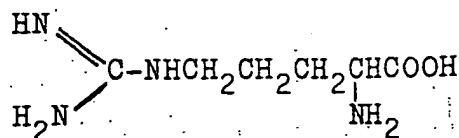
Die Erfindung umfaßt ferner die pharmazeutisch unbedenklichen Salze der Nonapeptidamidderivate sowie ein Verfahren zur Herstellung der neuen Verbindungen.

In dieser Beschreibung stehen (Pyr)Glu, His, Trp, Ser, Tyr, Phe, Gly, Leu, Ile, NLe, Val, NVal, Met, Arg und Pro für "Reste" von L-Pyroglutaminsäure, L-Histidin, L-Tryptophan, L-Serin, L-Tyrosin, L-Phenylalanin, Glycin, L-Leucin, L-Isoleucin, L-Norleucin, L-Valin, L-Norvalin, L-Methionin, L-Arginin bzw. L-Prolin. Unter dem "Rest" ist ein Radikal zu verstehen, das von der entsprechenden  $\alpha$ -Aminosäure durch Eliminierung des OH-Teils der Carboxylgruppe und des H-Teils der  $\alpha$ -Aminogruppe abgeleitet

309845/1153

2321174

ist. Beispielsweise stellt im Falle von L-Arginin



das durch die Formel  $\text{NH}_2\text{-A-COOH}$  dargestellt werden kann (worin  $\text{NH}_2$  der  $\alpha$ -Aminorest ist), das Radikal ( $\text{-NH-A-CO-}$ ) einen "Rest" von L-Arginin dar und wird als "-Arg-" abgekürzt. Die Abkürzungen für die anderen vorstehend genannten  $\alpha$ -Aminosäuren haben die entsprechende Bedeutung, wie sie vorstehend für L-Arginin dargelegt wurde.

Der vorstehend genannte Substituent R, d.h. der geradkettige oder verzweigte Alkylrest, der 1 bis 3 C-Atome enthält und mit einer Hydroxylgruppe substituiert sein kann, kann beispielsweise ein Methylrest, Äthylrest, n-Propylrest, Isopropylrest, Hydroxymethylrest, 1-Hydroxyäthylrest, 2-Hydroxyäthylrest, 2-Hydroxy-n-propylrest, 3-Hydroxy-n-propylrest oder 2,2-Dihydroxyisopropylrest sein.

Es ist seit vielen Jahren bekannt, daß der Hypothalamus Faktoren enthält, die bei höherer Konzentration die Sekretion der tropen Hormone aus der Hypophyse steuern. Kürzlich wurde anschließend an die Isolierung eines Thyrotropin freigebenden Hormons (TRH = Thyrotropin-releasing hormone) ein Hormon, das die Sekretion des luteinisierenden Hormons fördert, in reiner Form aus Schweinen und Schafen extrahiert und als Decapeptid der Struktur  $\text{H-(Pyr)Glu-His-Trp-Ser-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH}_2$  identifiziert (A.V.Schally und Mitarbeiter, Biochem. Biophys. Res. Commun., 43, 1334 (1971), R.Gnillemin und Mitarbeiter, Proc.Nat.Acad.Sci., USA., 69, 278(1972)). Dieser Feststellung folgte die Synthese einer Anzahl ähnlicher Peptide. Außerdem wurden biologische Tests mit diesen analogen Peptiden durchgeführt. Jedoch verringert selbst eine geringfügige Modifikation der vorstehend

309845/1153

2321174

genannten Aminosäurezusammensetzung stark die physiologische Aktivität des Peptids, und die vorstehende chemische Struktur wird als wesentlich für die Genese maximaler physiologischer Aktivität angesehen (A.V.Schally und Mitarbeiter, Biochem.Biophys.Res.Comm., 4, 366(1972)).

Der Anmelderin gelang die Synthetisierung der Nonapeptidamidderivate (I) sowie ihrer pharmazeutisch unbedenklichen Salze. Überraschenderweise wurde gefunden, daß diese Verbindungen eine stärkere ovulationsauslösende Wirkung haben als das natürlich vorkommende Decapeptid. Ferner wurde gefunden, daß diese Verbindungen auf die Hypophyse einwirken und die Sekretion sowohl des luteinisierenden Hormons als auch des follikelstimulierenden Hormons fördern. Ferner wurde von der Anmelderin gefunden, daß diese Verbindungen nicht nur wertvoll als Medikamente für den Menschen, z.B. als Medikamente für die Diagnose der Hypophysenfunktion oder des Gonadotropinmangels und für die Therapie der Amenorrhoe, sondern auch als Veterinärmedikamente insbesondere für die Zwecke der Viehzucht sind. Der Erfindung liegen die vorstehenden überraschenden Feststellungen zu Grunde.

Hauptgegenstand der Erfindung sind demgemäß die neuen Nonapeptidamidderivate und ihre pharmazeutisch unbedenklichen Salze mit starker ovulationsinduzierender Wirkung sowie ein Verfahren zur Herstellung der neuen Verbindungen.

Die Nonapeptidamidderivate der allgemeinen Formel (I) und ihre pharmazeutisch unbedenklichen Salze werden nach einem Verfahren hergestellt, das dadurch gekennzeichnet ist, daß man ein Reagens (A), nämlich L-Pyroglutaminsäure oder ein Peptidfragment, das eine L-Pyroglutaminsäureeinheit (d.h. H-(Pyr)Glu-) an seinem N-endständigen Teil und gleich anschließend daran die vorstehend genannte Aminosäuresequenz enthält, mit einem Reagens (B), nämlich einer Aminkomponente, die <sup>dem</sup> restlichen Teil des vorstehend

2321174

genannten, als Produkt gewünschten Nonapeptidamidderivats (I) entspricht, kondensiert, wobei die beiden Reagentien (A) und (B) wahlweise durch eine oder mehrere Schutzgruppen geschützt sind, und dann die gegebenenfalls vorhandenen Schutzgruppen entfernt.

Das Reagens (A) ist somit L-Pyroglutaminsäure oder ein Peptidfragment, das eine L-Pyroglutaminsäureeinheit an seinem N-endständigen Teil und gleichzeitig anschließend daran die Aminosäuresequenz der allgemeinen Formel (I) enthält, und das mit dem Reagens (A) zu kondensierende Reagens (B) ist eine Aminosäurekomponente, die dem restlichen Teil des vorstehend genannten, als Produkt gewünschten Nonapeptidamidderivats (I) entspricht. Die Reagentien (A) und (B) sind wahlweise geschützt.

Das Reagens (A) hat somit die folgende Beziehung zum Reagens (B):

Methode Nr.	Reagens (A)	Reagens (B)
1	H-(Pyr)Glu-OH	H-His-Trp-Ser-A <sub>1</sub> -Gly-A <sub>2</sub> -Arg-Pro-Y
2	H-(Pyr)Glu-His-OH	H-Trp-Ser-A <sub>1</sub> -Gly-A <sub>2</sub> -Arg-Pro-Y
3	H-(Pyr)Glu-His-Trp-OH	H-Ser-A <sub>1</sub> -Gly-A <sub>2</sub> -Arg-Pro-Y
4	H-(Pyr)Glu-His-Trp-Ser-OH	H-A <sub>1</sub> -Gly-A <sub>2</sub> -Arg-Pro-Y
5	H-(Pyr)Glu-His-Trp-Ser-A <sub>1</sub> -OH	H-Gly-A <sub>2</sub> -Arg-Pro-Y
6	H-(Pyr)Glu-His-Trp-Ser-A <sub>1</sub> -Gly-OH	H-A <sub>2</sub> -Arg-Pro-Y

309845/1153

2321174

Metho- de Nr.	Reagens (A)	Reagens (B)
7	H-(Pyr)Glu-His-Trp- Ser-A <sub>1</sub> -Gly-A <sub>2</sub> -OH	H-Arg-Pro-Y
8	H-(Pyr)Glu-His-Trp- Ser-A <sub>1</sub> -Gly-A <sub>2</sub> -Arg-OH	H-Pro-Y
9	H-(Pyr)Glu-His-Trp- Ser-A <sub>1</sub> -Gly-A <sub>2</sub> -Arg-Pro- OH	H-Y

Wenn eine Verbindung aus der linken Spalte als Reagens (A) verwendet wird, wird die Verbindung in der rechten Spalte in der gleichen Zeile als Reagens (B), d.h. als entsprechende Gegenverbindung des Reagens (A) bei der Kondensationsreaktion verwendet. Die Reagentien (A) und/oder (B) können vor der Kondensationsreaktion geschützt oder während der Kondensationsreaktion, genauer gesagt, vor der Bildungsreaktion der Peptidbindung, aktiviert werden. Hierauf wird nachstehend ausführlicher eingegangen. Wie dem Fachmann auf dem Gebiet der Peptidsynthese bekannt ist, können alle Arten von Peptiden durch Kondensation einer Aminosäure oder eines Peptidfragments (d.h. eines Peptids mit weniger Einheiten) mit einer Aminosäure oder einem Peptidfragment (d.h. Peptid mit weniger Einheiten) hergestellt werden. Eine Anzahl ausgereifter Verfahren zur Durchführung der Kondensationsreaktion ist bereits entwickelt worden.

Beispielsweise kann man die funktionelle Gruppe oder die funktionellen Gruppen (z.B. die Aminogruppe, Carboxylgruppe, Hydroxylgruppe, Guanidingruppe), die an der Bildungsreaktion der Peptidbindung (d.h. -CONH-) über die Kondensationsreaktion nicht beteiligt sind, vor der Kondensationsreaktion durch die Schutzgruppe oder Schutzgruppen schützen. Beim Verfahren gemäß der Erfindung kann

2321174

man die nicht an der Kondensationsreaktion teilnehmenden funktionellen Gruppen von Reagens (A) oder (B) ebenfalls nach an sich bekannten Methoden schützen.

Bekanntlich wird vor der Bildungsreaktion der Peptidbindung die C-endständige Carboxylgruppe oder die N-endständige Aminogruppe einer Aminosäure oder eines Peptidfragments, die an der Bildungsreaktion der Peptidbindung beteiligt ist, aktiviert, damit sie die Bildung der Peptidbindung zustande bringt, und, wenn die Aktivierung nicht erfolgt, die Bildungsreaktion der Peptidbindung <sup>wird</sup> in Gegenwart eines Dehydratisierungsmittels durchgeführt.

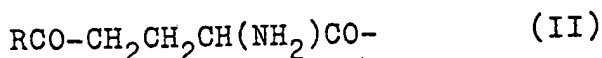
Verfahren zur Aktivierung der C-endständigen Carboxylgruppe sowie der N-endständigen Aminogruppe sind allgemein bekannt. Das Verfahren gemäß der Erfindung kann in an sich bekannter Weise durchgeführt werden. Die Kondensation gemäß der Erfindung kann somit vorgenommen werden, indem man in einer ersten Stufe die C-endständige Carboxylgruppe des Reagens (A) oder die N-endständige Aminogruppe des Reagens (B) aktiviert und in der zweiten Stufe die Bildungsreaktion der Peptidbindung zwischen dem aktivierten Reagens (A) und dem Reagens (B) oder zwischen dem Reagens (A) und dem aktivierten Reagens (B) durchführt oder als Alternative die Bildungsreaktion der Peptidbindung zwischen dem Reagens (A) und dem Reagens (B) in Gegenwart eines Dehydratisierungsmittels durchführt, wobei die Reagentien (A) und (B) wahlweise geschützt sind.

Es ist ferner bekannt, daß in Fällen, in denen die vorstehend genannten funktionellen Gruppen durch eine oder mehrere Schutzgruppen vor der Kondensationsreaktion geschützt werden, die schützende Gruppe oder schützenden Gruppen nach der Kondensationsreaktion entfernt werden. Beim Verfahren gemäß der Erfindung kann die Entfernung der Schutzgruppen ebenfalls in bekannter Weise vorgenommen werden.

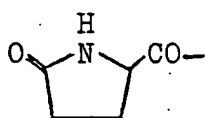
309845/1153

2321174

Es ist in diesem Zusammenhang ebenfalls bekannt, daß eine geschützte L-Glutamylgruppe der allgemeinen Formel



in der R ein Alkoxyrest (z.B. ein Methoxyrest, Äthoxyrest, n-Propoxyrest, Isopropoxyrest oder n-Butoxyrest), ein Aralkyloxyrest (z.B. ein Benzyloxyrest) oder eine Amino-  
gruppe ist, sich durch Umsetzung mit einer Base (z.B. Ammoniak) oder einer Säure (z.B. Essigsäure) leicht in die L-Pyroglutamylgruppe selbst



umwandeln läßt, und daß die Gruppe (II) hierbei der L-Pyroglutamylgruppe selbst äquivalent ist. Beim Verfahren gemäß der Erfindung ist vorauszusetzen, daß das L-Pyroglutamyl (d.h. H-(Pyr)Glu-) des Reagens (A) nicht nur die L-Pyroglutamylgruppe selbst, sondern auch die geschützte L-Glutamylgruppe der Formel (II) einschließt. Wenn H-(Pyr)Glu- des Reagens (A) die Gruppe (II) ist, läßt sich diese in an sich bekannter Weise leicht in die L-Pyroglutamylgruppe selbst umwandeln.

Nachstehend werden einige Verfahren aufgeführt, die vorteilhaft zur Durchführung der Bildungsreaktion der Peptidbindung gemäß der Erfindung angewandt werden können.

I) Das geschützte oder ungeschützte Reagens (A), dessen C-endständige Carboxylgruppe eine freie Carboxylgruppe ist, wird mit dem geschützten oder ungeschützten Reagens (B), dessen N-endständige Amino-  
gruppe eine freie Aminogruppe ist, in Gegenwart eines Kondensationsmittels umgesetzt.

II) Das geschützte oder ungeschützte Reagens (A), dessen C-endständige Carboxylgruppe aktiviert worden ist, wird mit dem Reagens (B) umgesetzt, dessen



2321174

N-endständige Aminogruppe eine freie Aminogruppe ist.

III) Das geschützte oder ungeschützte Reagens A, dessen C-endständige Carboxylgruppe frei ist, wird mit dem geschützten oder ungeschützten Reagens (B) umgesetzt, dessen N-endständige Aminogruppe aktiviert worden ist.

Als Schutzgruppe für die innermolekulare Acylaminogruppe der L-Pyroglutaminsäure kommen somit beispielsweise die Benzyloxycarbonylgruppe, tert.-Butoxycarbonylgruppe und Isobornyloxycarbonylgruppe, als Schutzgruppe für die Iminogruppe von L-Histidin beispielsweise die Benzylgruppe, Tosylgruppe, 2,4-Dinitrophenylgruppe, tert.-Butoxycarbonylgruppe und Carbobenzoxygruppe, als Schutzgruppe für die Hydroxylgruppe von L-Serin beispielsweise ätherbildende Gruppen, z.B. die Benzylgruppe und tert.-Butylgruppe, als Schutzgruppe für die Hydroxylgruppe von Tyrosin beispielsweise ätherbildende Gruppen, z.B. die Benzylgruppe und tert.-Butylgruppe, und als Schutzgruppe für die Guanidinogruppe von L-Arginin beispielsweise die Nitrogruppe, Tosylgruppe, Carbobenzoxygruppe, Isobornyloxycarbonylgruppe und Adamantyloxycarbonylgruppe in Frage. Ferner kann die Guanidinogruppe von L-Arginin durch Salzbildung mit einem Proton, das von einer Säure (z.B. Salzsäure und Bromwasserstoffsäure) abgeleitet ist, geschützt werden. Natürlich ist das Proton im Rahmen dieser Beschreibung als zu den Schutzgruppen gehörend anzusehen.

Als Beispiele der aktivierten Form der C-endständigen Carboxylgruppe des Reagens (A) sind die entsprechenden Säureanhydride, z.B. die gemischten Anhydride mit einem Kohlensäuremonoalkylester, Azide und aktiven Ester (z.B. die entsprechenden Ester mit Alkoholen wie Pentachlorphenol, 2,4,5-Trichlorphenol, 2,4-Dinitrophenol, Cyanmethyllalkohol, p-Nitrophenol, N-Hydroxysuccinimid, N-Hydroxy-5-norbornen-2,3-dicarboximid, N-Hydroxyphthal-

309845/1153

2321174

imid und N-Hydroxybenztriazol) zu nennen. Von diesen Estern wird der N-Hydroxy-5-norbornen-2,3-dicarboximid-ester bevorzugt. Die N-Hydroxy-5-norbornen-2,3-dicarboximidester von Aminosäuren oder Peptiden sind zwar neu, können jedoch in der gleichen Weise wie die N-Hydroxy-succinimidester von Aminosäuren oder Peptiden hergestellt werden.

Das entsprechende Amid der phosphorigen Säure ist ein Beispiel einer aktivierten Form der N-endständigen Aminogruppe des geschützten oder ungeschützten Reagens (B).

Als Dehydratisierungsmittel können alle Verbindungen der Art, die für die Peptidsynthese geeignet sind, verwendet werden. Besonders bevorzugt werden beispielsweise die sog. Carbodiimidreagentien, z.B. Dicyclohexylcarbodiimid.

Zur Durchführung der Kondensationsreaktion gemäß der Erfindung können natürlich in einen einzelnen Reaktor 1) das geschützte oder ungeschützte Reagens (A), dessen C-endständige Carboxylgruppe frei ist, 2) das geschützte oder ungeschützte Reagens (B), dessen N-endständige Aminogruppe frei ist, 3) der vorstehend genannte Alkohol (z.B. N-Hydroxy-5-norbornen-2,3-dicarboximid oder N-Hydroxysuccinimid) und 4) das Dehydratisierungsmittel gegeben werden. In diesem Fall reagiert zuerst das geschützte oder ungeschützte Reagens (A), dessen C-endständige Carboxylgruppe frei ist, mit dem Alkohol mit Hilfe des Dehydratisierungsmittels unter Bildung des geschützten oder ungeschützten Reagens (A), dessen C-endständige Carboxylgruppe aktiviert ist, worauf das letztere mit dem geschützten oder ungeschützten Reagens (B), dessen N-endständige Aminogruppe frei ist, reagiert. Bei diesem Prozess werden die Aktivierung der C-endständigen Carboxylgruppe und die Bildungsreaktion der Peptidbindung in einem Einstufenverfahren durchgeführt.

2321174

Für die Herstellung der vorstehend beschriebenen, als Produkte gewünschten Peptide stehen somit die verschiedensten Kombinationen von Verfahren zur Auswahl. Eine bevorzugte Ausführungsform des Verfahrens gemäß der Erfindung ist nachstehend schematisch dargestellt:

(I)  $\text{H-(Pyr)Glu-His-Trp-Ser-A}_1\text{-Gly-OH}$  (Reagens (A))

+ DCC + HONBI

↓ Aktivierung

$\text{H-(Pyr)Glu-His-Trp-Ser-A}_1\text{-Gly-ONBI}$  +  $\text{H-A}_2\text{-Arg-Pro-Y}$

(Aktiviertes Reagens (A))

(Geschütztes Reagens (B))

↓ Bildung der Peptidbindung

$\text{H-(Pyr)Glu-His-Trp-Ser-A}_1\text{-Gly-A}_2\text{-Arg-Pro-Y}$

↓ Entfernung der Schutzgruppen

$\text{H-(Pyr)Glu-His-Trp-Ser-A}_1\text{-Gly-A}_2\text{-Arg-Pro-Y}$

(II)  $\text{H-(Pyr)Glu-His-Trp-Ser-A}_1\text{-Gly-OH}$  +  $\text{H-A}_2\text{-Arg-Pro-Y}$

(Reagens (A))

(Geschütztes Reagens (B))

+ DCC + HONBI

① Aktivierung

② Bildung der Peptidbindung

$\text{H-(Pyr)Glu-His-Trp-Ser-A}_1\text{-Gly-A}_2\text{-Arg-Pro-Y}$

↓ Entfernung der Schutzgruppen

$\text{H-(Pyr)Glu-His-Trp-Ser-A}_1\text{-Gly-A}_2\text{-Arg-Pro-Y}$

309845/1153

2321174

Im vorstehenden Schema bedeuten DCC das N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid, HONBI das N-Hydroxy-5-norbornen-2,3-dicarboximid und Z eine Schutzgruppe der Guanidinogruppe des L-Argininrestes.

Die Bildungsreaktion der Peptidbindung, z.B. nach den vorstehend genannten Verfahren (I), (II) oder (III), wird im allgemeinen in einem Lösungsmittel durchgeführt. Als Lösungsmittel eignen sich beispielsweise trockenes oder wässriges Dimethylformamid, Dimethylsulfoxyd, Pyridin, Chloroform, Dioxan, Dichlormethan, Tetrahydrofuran und Gemische dieser Lösungsmittel.

Die Reaktionstemperatur liegt gewöhnlich im Bereich von etwa  $-20^{\circ}\text{C}$  bis  $30^{\circ}\text{C}$ , jedoch kann die Reaktion auch bei niedrigeren Temperaturen oder unter Erhitzen durchgeführt werden.

Die beiden Ausgangsmaterialien, die eine Peptidbindung bilden sollen, werden gewöhnlich in äquimolaren Mengen verwendet, jedoch sind gegebenenfalls auch andere Mengenverhältnisse geeignet. Im allgemeinen werden für jedes molare Äquivalent eines Ausgangsmaterials gewöhnlich etwa 1 bis 2 molare Äquivalente, vorzugsweise etwa 1 bis 1,4 molare Äquivalente der zugehörigen Verbindung (d.h. der Gegenverbindung) verwendet. Der Anteil des Dehydratisierungsmittels beträgt im allgemeinen etwa 1 bis 2 molare Äquivalente, bezogen auf das Wasser, das bei der Bildungsreaktion der Peptidbindung gebildet wird.

Gute Ergebnisse werden in vielen Fällen erhalten, wenn die Reaktion etwa 6 bis 10 Stunden durchgeführt wird.

Nach Beendigung der Bildungsreaktion der Peptidbindung kann das Reaktionsprodukt beispielsweise durch Ausfällung mit einem Lösungsmittel (in dem die gewünschte Verbindung schwer löslich ist) und anschließendes Abfiltrieren der gebildeten Fällung isoliert werden.

2321174

Wenn das Reagens (A) und/oder das Reagens (B) durch die Schutzgruppe oder Schutzgruppen geschützt sind, enthält das Kondensationsprodukt im allgemeinen die Schutzgruppe oder Schutzgruppen in seinem Molekül. Wie bereits erwähnt, werden jedoch die Schutzgruppe oder Schutzgruppen nach üblichen Methoden entfernt, die die Aminosäuresequenz des gewünschten Nonapeptidamidderivats nicht beeinträchtigen. Nach der Entfernung der Schutzgruppen bleibt das von Schutzgruppen freie Nonapeptidamidderivat (I) zurück.

Als Beispiele solcher üblichen Verfahren sind die katalytische Reduktion mit einem Katalysator wie Palladiumschwarz, Palladiumkohle oder Platin, die Säurehydrolyse beispielsweise mit Fluorwasserstoff oder Trifluoressigsäure und die chemische Reduktion beispielsweise mit Natriummetall in flüssigem Ammoniak zu nennen. Bei jedem dieser Verfahren kann die gewünschte Verbindung nach üblichen Methoden, z.B. durch die oben beschriebene Ausfällung, isoliert werden.

Das in dieser Weise isolierte Endprodukt kann nach üblichen Methoden, z.B. durch Säulenchromatographie beispielsweise an Carboxymethylcellulose und handelsüblichen Polymerisaten für die Reinigung, z.B. an den Ionenaustauscherharzen "Sephadex" oder "Amberlite XAD-2", gereinigt werden.

In Abhängigkeit von den Reaktionsbedingungen wird die gewünschte Verbindung in Form einer Base oder als Salz einschließlich der pharmazeutisch unbedenklichen Salze erhalten. Aus dem Salz kann die Base nach üblichen Verfahren hergestellt werden, und die Base kann durch Umsetzung mit Säuren, die für die Herstellung pharmazeutisch unbedenklicher Salze geeignet sind, in Salze umgewandelt werden. Als Säuren eignen sich für diesen Zweck verschiedene anorganische Säuren, z.B. Halogenwasserstoffsäuren wie Salzsäure, Bromwasserstoffsäure, Perchlorsäure, Salpetersäure, Thiocyanensäure, Schwefelsäure

309845/1153

2321174

und Phosphorsäure, und verschiedene organische Säuren, z.B. Ameisensäure, Essigsäure, Propionsäure, Glykolsäure, Milchsäure, Brenztraubensäure, Oxalsäure, Malonsäure, Bernsteinsäure, Maleinsäure, Fumarsäure, Anthranylsäure, Zimtsäure, Naphthalinsulfonsäure und Sulfanylsäure.

Die in der vorstehend beschriebenen Weise erhaltenen Endprodukte können nach üblichen Methoden in Metallkomplexsalzverbindungen umgewandelt werden. Beispielsweise kann eine wässrige Lösung des in der oben beschriebenen Weise hergestellten Nonapeptidamidderivats mit einem oder mehreren Salzen, Hydroxyden oder Oxyden von Zink, Nickel, Kobalt, Kupfer und Eisen umgesetzt und das Reaktionsgemisch dann auf einen  $p_H$ -Wert von etwa 6 bis 8 eingestellt werden, wobei eine wenig lösliche Adsorptionskomplexsalzverbindung zwischen der als Träger dienenden Metallverbindung und dem jeweiligen Nonapeptidamidderivat erhalten wird.

Es hat sich gezeigt, daß von den in dieser Weise herstellbaren verschiedenen Metallkomplexsalzverbindungen die Zinkkomplexsalzverbindungen vom Standpunkt ihrer lang anhaltenden Aktivität nach der Verabreichung am vorteilhaftesten sind.

Auf Grund ihrer äußerst geringen Toxizität können die in der vorstehend beschriebenen Weise hergestellten Nonapeptidamidderivate oder ihre pharmazeutisch unbedenklichen Salze unbedenklich verabreicht werden. Diese Verbindungen zeigen eine starke ovulationsinduzierende Wirkung.

Wenn Ratten eine winzige Menge (z.B. 50 bis 500 ng/100 g) des Nonapeptidamidderivats (I) oder dessen pharmazeutisch unbedenklichen Salzes intravenös, intramuskulär oder subkutan erhalten, ist ein steiler Anstieg der Konzentration des luteinisierenden Hormons und des follikelstimulierenden Hormons im Blut festzustellen.

Wenn Ratten eine Infusion von 10 bis 200 ng/100 g der Verbindung intravenös oder intramuskulär erhalten, wird die Ovulation bei etwa 50% der Ratten ausgelöst. Wenn die Ratten eine Infusion von 0,1 bis 5 µg/100 g der Verbindung intravenös oder intramuskulär erhalten, wird die Ovulation bei 100% der als Versuchstiere verwendeten Ratten ausgelöst, auch wenn die Ratten sich im Diöstrus befinden. Bei unveränderter Dosis ist die intravenöse Infusion im allgemeinen doppelt so wirksam wie die subkutane Infusion.

Die vorstehenden Werte zeigen, daß die Peptide gemäß der Erfindung stärkere Hormonwirkungen haben als das natürlich vorkommende, die Sekretion des luteinisierenden Hormons auslösende Hormon.

Injektionslösungen können durch Auflösen der Verbindungen gemäß der Erfindung in physiologischer Kochsalzlösung hergestellt werden.

Da diese Verbindungen auch bei Verwendung in sehr winzigen Mengen eine genügende physiologische Wirkung aufweisen, ist es zweckmäßig, sie als gefriergetrocknete Ampullenpräparate, die Mannit als Hilfsstoff enthalten, zu verwenden.

Die Erfindung wird durch die folgenden Beispiele weiter erläutert. In diesen Beispielen werden die folgenden Abkürzungen mit den nachstehend genannten Bedeutungen verwendet:

Z-: Benzyloxycarbonyl; IBOC-: Isobornyloxycarbonyl;  
BOC-: tert.-Butyloxycarbonyl; -OEt: Äthylester;  
-OSU: N-Hydroxysuccinimidester; -OtBu: tert.-Butylester;  
-ONDP: 2,4-Dinitrophenolester; -ONBI: N-Hydroxy-5-norbornen-2,3-dicarbonsäureimidester;  
HONBI: N-Hydroxy-5-norbornen-2,3-dicarbonsäureimid;  
DCC: N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid; DMF: N,N-Dimethylformamid; DSC: Dünnschichtchromatographie; DCHA: Dicyclohexyl-

2321174

amin.

Für die Dünnschichtchromatographie werden die folgenden Entwicklerlösungsmittelsysteme verwendet:

Rf 1 = Chloroform-Methanol-Essigsäure (9:1:0,5)

Rf 2 = Äthylacetat-Pyridin-Essigsäure-Wasser (60:20:6:11)

Rf 3 = n-Butanol-Äthylacetat-Essigsäure-Wasser (1:1:1:1)

Rf 4 = n-Butanol-Essigsäure-Wasser (4:1:1)

Rf 5 = n-Butanol-Pyridin-Essigsäure-Wasser (30:20:6:24).

In den Beispielen verhalten sich Gewichtsteile zu Raumteilen wie Gramm zu Kubikzentimeter. Die Prozentsätze sind auf das Gewicht bezogen, falls nicht anders angegeben. Die folgenden Ionenaustauscherharze werden verwendet:

"Amberlite CG-400" (Copolymerisat von tertiärem Amin, Styrol und Divinylbenzol, Hersteller Rohm & Haas Co., USA);

"Sephadex LH 20" (verestertes Dextrangel, Hersteller Pharmacia Fine Chemicals, Sweden); "Amberlite XAD-2" (makroretikuläres Styrol-Divinylbenzol-Copolymerisat) und

"Amberlite IRA-400" (Copolymerisat von tertiärem Amin, Styrol und Divinylbenzol, Hersteller Rohm & Haas Co., USA).

#### Beispiel 1

Herstellung von H-(Pyr)Glu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-NHC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>

##### a) Herstellung von Z-Arg(NO<sub>2</sub>)-Pro-NHC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>

In 10 Raumteilen DMF werden 0,901 Gew.-Teile Z-Arg(NO<sub>2</sub>)-Pro-OH und 0,181 Gew.-Teile Äthylaminhydrochlorid gelöst. Während bei 0°C gehalten wird, werden 0,38 Raumteile Triäthylamin zugetropft. Nach Zusatz von 0,43 Gew.-Teilen HONBI und 0,495 Gew.-Teilen DCC wird das Gemisch 5 Stunden bei 0°C und dann 10 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Der als Nebenprodukt gebildete Harnstoff wird abfiltriert und das DMF abdestilliert. Der Rückstand wird mit Chloroform extrahiert, mit Wasser gewaschen und über

309845/1153



2321174

wasserfreiem Magnesiumsulfat getrocknet. Das Chloroform wird abdestilliert und der Rückstand mit Äther behandelt und aus Methanol-Äther erneut ausgefällt. Ausbeute 0,692 Gew.-Teile;  $R_f$  1 = 0,50; Schmelzpunkt  $141^{\circ}$ - $145^{\circ}$ C (Zers.);  $[\alpha]_D^{24} = 44,6^{\circ}$  ( $c=1$ , Methanol).

Elementaranalyse:

	<u>C</u>	<u>H</u>	<u>N</u>
Berechnet für $C_{21}H_{31}O_6N_7$ :	52,82	6,54	20,53
Gefunden:	52,95	6,77	19,65

b) Herstellung von Z-Leu-Arg(NO<sub>2</sub>)-Pro-NHC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>

In 5 Raumteilen 25% HBr-Essigsäure werden 0,572 Gew.-Teile Z-Arg(NO<sub>2</sub>)-Pro-NHC<sub>2</sub>H<sub>5</sub> gelöst. Die Lösung wird 30 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Dann wird trockener Äther zum Reaktionsgemisch gegeben und die gebildete Fällung abfiltriert und getrocknet. Getrennt hiervon werden 0,291 Gew.-Teile Z-Leu-OH in 5 Raumteilen Dioxan gelöst. Unter Kühlen werden 0,247 Gew.-Teile DCC und 0,215 Gew.-Teile HONBI zugesetzt. Das Gemisch wird 2 Stunden gerührt und der als Nebenprodukt gebildete Harnstoff abfiltriert. Zum Filtrat wird die in der oben beschriebenen Weise erhaltene Fällung gegeben, die durch Zusatz von 3 Raumteilen DMF gelöst wird. Während gekühlt wird, werden 0,17 Raumteile Triäthylamin zugetropft, worauf das Gemisch über Nacht bei Raumtemperatur gerührt wird. Das Lösungsmittel wird abdestilliert und der Rückstand mit Chloroform extrahiert und mit Wasser gewaschen. Die Chloroformschicht wird über wasserfreiem Magnesiumsulfat getrocknet und das Chloroform abdestilliert. Der Rückstand wird mit Äther behandelt und aus Methanol-Äther erneut ausgefällt. Ausbeute 0,47 Gew.-Teile (72%); Schmelzpunkt  $144^{\circ}$  bis  $146^{\circ}$ C (Zers.);  $R_f$  1 = 0,40;  $[\alpha]_D^{24} = -58,0^{\circ}$  ( $c=1$ , Methanol).

c) In 25% HBr-Essigsäure werden 0,165 Gew.-Teile Z-Leu-Arg(NO<sub>2</sub>)-Pro-NHC<sub>2</sub>H<sub>5</sub> gelöst. Die Lösung wird 30 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Dann wird

2321174

trockener Äther dem Reaktionsgemisch zugesetzt und die gebildete Fällung abfiltriert und gut getrocknet. Diese Fällung wird in 3 Raumteilen DMF gelöst. Während gekühlt und gerührt wird, werden 0,05 Raumteile N-Äthylmorpholin zugetropft. In dieser Lösung werden 0,19 Raumteile H-(Pyr)Glu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-OH-hydrochlorid gelöst. Zur Lösung werden 0,054 Gew.-Teile HONBI und 0,062 Gew.-Teile DCC gegeben.

Das Gemisch wird 2 Stunden bei 0° und dann über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Der als Nebenprodukt gebildete Harnstoff wird abfiltriert und das DMF abdestilliert. Der Rückstand wird mit Äthylacetat behandelt, wobei 0,32 Gew.-Teile eines Pulvers erhalten werden. Dieses Produkt wird auf eine Säule von Amberlite XAD-2 aufgegeben und in einem Elutionssystem mit linearem Gradienten von 5%igem wässrigem Äthanol bis Äthanol desorbiert. Die Hauptfraktion wird gefriergetrocknet, wobei 0,11 Raumteile reines H-(Pyr)Glu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg(NO<sub>2</sub>)-Pro-NHC<sub>2</sub>H<sub>5</sub> erhalten werden. Dieses Produkt wird 1 Stunde mit 4 Raumteilen Fluorwasserstoff bei 0°C in Gegenwart von 0,02 Raumteilen Anisol und 0,02 Raumteilen Mercaptoäthanol behandelt. Der Fluorwasserstoff wird abdestilliert und der Rückstand nach der Trocknung in Wasser gelöst. Die Lösung wird durch eine Säule von Amberlite IRA-400 (Acetatform) geleitet und dann an einer Carboxymethylcellulosesäule adsorbiert. Die Säule wird in einem Elutionssystem mit linearem Gradienten von wässrigem 0,005N Ammoniumacetat bis zu wässrigem 0,2N Ammoniumacetat eluiert. Die Hauptfraktion wird gefriergetrocknet. Hierbei werden 0,087 Gew.-Teile reines H-(Pyr)Glu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-NHC<sub>2</sub>H<sub>5</sub> erhalten.  $R_f 3 = 0,36$ ;  $\alpha_D^{24} = -56,2^\circ$  (c=0,5, 5% Essigsäure).

Aminosäureanalyse: His 0,95 (1); Arg 0,98 (1); Ser 0,95 (1); Glu 0,98 (1); Pro 1,00 (1); Gly 1,00(1); Leu 1,00(1); Tyr 1,00(1); NH<sub>2</sub>C<sub>2</sub>H<sub>5</sub> 1,10 (1).

Die Klammerzahlen sind die berechneten Werte.

309845/1153

2321174

Beispiel 2

Herstellung von H-(Pyr)Glu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-NHC<sub>2</sub>H<sub>4</sub>OH

a) Herstellung von Z-Arg(NO<sub>2</sub>)-Pro-NHC<sub>2</sub>H<sub>4</sub>OH

In 5 Raumteilen DMF werden 0,9 Gew.-Teile Z-Arg(NO<sub>2</sub>)-Pro-OH und 0,43 Gew.-Teile HONBI gelöst. Während bei 0°C gehalten wird, werden 0,495 Gew.-Teile DCC zugesetzt. Das Gemisch wird über Nacht gerührt. Die abgeschiedene Harnstoffverbindung wird abfiltriert. Zum Filtrat werden 0,1832 Gew.-Teile Äthanolamin gegeben. Das Gemisch wird über Nacht gerührt. Das DMF wird unter vermindertem Druck abdestilliert. Zum Rückstand wird Dioxan gegeben. Die unlöslichen Bestandteile werden abfiltriert. Das Dioxan wird unter vermindertem Druck destilliert und der Rückstand mit n-Butanol extrahiert. Der Extrakt wird mit Wasser, verdünnter Salzsäure, Wasser, einer wässrigen Natriumhydrogencarbonatlösung und Wasser in dieser Reihenfolge gewaschen, worauf das n-Butanol unter vermindertem Druck abdestilliert wird. Der Rückstand wird mit Äther behandelt und aus Methanol-Äther erneut ausgefällt. Ausbeute 0,625 Gew.-Teile (63,3%); Schmelzpunkt 124° bis 128°C (Zers.); Rf 2 = 0,23;  $[\alpha]_D^{20} = -36,6^\circ$  (c=0,5, Äthanol).

b) Herstellung von Z-Leu-Arg(NO<sub>2</sub>)-Pro-NHC<sub>2</sub>H<sub>4</sub>OH

In 2 Raumteilen 25% HBr-Essigsäure werden 0,493 Gew.-Teile Z-Arg(NO<sub>2</sub>)-Pro-NHC<sub>2</sub>H<sub>4</sub>OH gelöst. Die Lösung wird 30 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Dann wird trockener Äther zugesetzt und die erhaltene Fällung abfiltriert und getrocknet, wobei ein pulverförmiges Produkt erhalten wird. Getrennt hiervon werden 0,282 Gew.-Teile Z-Leu-OH und 0,215 Gew.-Teile HONBI in 3 Raumteilen DMF gelöst. Während bei 0°C gehalten wird, werden 0,248 Gew.-Teile DCC zugesetzt, worauf 2 Stunden gerührt wird. Der Lösung wird das oben genannte pulverförmige Produkt zugesetzt, worauf 0,15 Raumteile Triäthylamin zugetropft werden. Das

309845/1153

2321174

Gemisch wird über Nacht gerührt. Der Harnstoff wird abfiltriert und das DMF unter vermindertem Druck abdestilliert. Der Rückstand wird auf eine Säule von 50 Gew.-Teilen Kieselgel aufgegeben und mit einem Lösungsmittelsystem aus Chloroform-Methanol-Essigsäure (9:1:0,5) desorbiert. Die Lösungsmittel werden abdestilliert und der Rückstand mit Äther kristallisiert. Ausbeute 0,153 Gew.-Teile; Schmelzpunkt  $110^{\circ}$  bis  $113^{\circ}\text{C}$  (Zers.);  $R_f 1 = 0,49$ ;  $[\alpha]_D^{20} = -46,6^{\circ}$  ( $c = 0,5$ , Äthanol).

c) 0,152 Gew.-Teile Z-Leu-Arg( $\text{NO}_2$ )-Pro-NHC<sub>2</sub>H<sub>4</sub>OH werden in Gegenwart von 0,1 Raumteil Anisol in 3 Raumteilen Fluorwasserstoff gelöst. Die Lösung wird 1 Stunde bei  $0^{\circ}\text{C}$  gerührt. Der Fluorwasserstoff wird abdestilliert und der Rückstand gut getrocknet und in Wasser gelöst. Nach Zusatz einer geringen Menge konzentrierter Salzsäure wird die Lösung mit Äther gewaschen und die wässrige Schicht gefriergetrocknet. Das erhaltene Pulver wird in 5 Raumteilen DMF zusammen mit 0,19 Raumteilen H-(Pyr)Glu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-OH-hydrochlorid und 0,0493 Gew.-Teilen HONBI gelöst. Die Lösung wird auf  $0^{\circ}\text{C}$  gekühlt, worauf 0,0567 Gew.-Teile DCC und 0,07 Raumteile N-Äthylmorpholin zugesetzt werden. Das Gemisch wird über Nacht gerührt. Das DMF wird unter vermindertem Druck abdestilliert und der Rückstand in Wasser gelöst. Die unlöslichen Bestandteile werden abfiltriert und das Filtrat durch eine Säule von Amberlite IRA-400 (Acetatform) geleitet. Der Ablauf wird aufgefangen und gefriergetrocknet. Das Produkt wird auf eine Säule von Amberlite XAD-2 aufgegeben und in einem Elutionssystem mit linearem Gradienten von Wasser-Methanol desorbiert. Die Hauptfraktion wird gefriergetrocknet, wobei 0,023 Gew.-Teile reines H-(Pyr)Glu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-NHC<sub>2</sub>H<sub>4</sub>OH erhalten werden.  $R_f 3 = 0,28$ ;  $[\alpha]_D^{20} = -54,4^{\circ}$  ( $c = 0,5$ , 5%ige wässrige Essigsäurelösung).

Aminosäureanalyse: His 1,00(1); Arg 1,05(1); Ser 0,95(1);  
Glu 1,00(1); Pro 1,05(1); Gly 1,00(1); Leu 0,95(1);  
Tyr 0,76(1). Die Klammerzahlen sind die berechneten Werte.

### Beispiel 3

Herstellung von H-(Pyr)Glu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-  
Pro-NHCH<sub>3</sub>

#### a) Herstellung von Z-Arg(NO<sub>2</sub>)-Pro-NHCH<sub>3</sub>

In 5 Raumteilen DMF werden 0,675 Gew.-Teile Z-Arg(NO<sub>2</sub>)-Pro-OH und 0,101 Gew.-Teile Methylaminhydrochlorid gelöst. Während die Lösung bei 0°C gehalten wird, werden 0,21 Raumteile Triäthylamin zugetropft. Nach Zusatz von 0,322 Gew.-Teilen HONBI und 0,37 Gew.-Teilen DCC wird das Gemisch 5 Stunden bei 0°C und dann 10 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Der als Nebenprodukt gebildete Harnstoff wird abfiltriert und das DMF abdestilliert. Der Rückstand wird mit Chloroform extrahiert, mit Wasser gewaschen und über wasserfreiem Magnesiumsulfat getrocknet. Das Chloroform wird abdestilliert und der Rückstand mit Äthanol behandelt und aus Methanol-Äther erneut ausgefällt. Ausbeute 0,612 Gew.-Teile (88%); Rf 1 = 0,30; Schmelzpunkt 137° bis 143°C (Zers.);  $[\alpha]_D^{24} = -41,5^\circ$  (c=1, Methanol).

#### Elementaranalyse:

Berechnet für C<sub>20</sub>H<sub>29</sub>O<sub>6</sub>N<sub>7</sub>:

Gefunden:

	<u>C</u>	<u>H</u>	<u>N</u>
Berechnet	51,82	6,31	21,15
Gefunden	51,84	6,54	21,57

#### b) Herstellung von Z-Leu-Arg(NO<sub>2</sub>)-Pro-NHCH<sub>3</sub>

In 5 Gew.-Teilen 25% HBr-Essigsäure werden 0,556 Gew.-Teile Z-Arg(NO<sub>2</sub>)-Pro-NHCH<sub>3</sub> gelöst. Die Lösung wird 30 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Dann wird trockener Äther zugesetzt, worauf die gebildeten Kristalle abfiltriert und getrocknet werden. Getrennt hiervon werden 0,312 Gew.-Teile Z-Leu-OH in 5 Raumteilen Dioxan-Äthylacetat (1:1) gelöst. Während die Lösung gekühlt wird,

werden 0,268 Gew.-Teile DCC und 0,232 Gew.-Teile HONBI zugesetzt. Das Gemisch wird 2 Stunden gerührt. Der als Nebenprodukt gebildete Harnstoff wird abfiltriert. Zum Filtrat werden die in der oben beschriebenen Weise hergestellten Kristalle gegeben und durch Zusatz von 3 Raumteilen DMF gelöst. Während gekühlt wird, werden 0,17 Raumteile Triäthylamin zugesetzt. Das Gemisch wird über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wird abdestilliert. Der Rückstand wird mit Chloroform extrahiert und mit Wasser gewaschen. Die Chloroformschicht wird über wasserfreiem Magnesiumsulfat dehydratisiert, worauf das Chloroform abdestilliert wird. Der Rückstand wird mit Äther behandelt und aus Methanol-Äther erneut ausgefällt. Ausbeute 0,45 Gew.-Teile (78%);  $R_f$  1 = 0,25.

Elementaranalyse:

	<u>C</u>	<u>H</u>	<u>N</u>
Berechnet für $C_{26}H_{40}O_7N_8$ :	54,15	7,02	19,43
Gefunden:	54,37	6,98	19,52

c) In 5 Raumteilen 25% HBr-Essigsäure werden 0,144 Gew.-Teile Z-Leu-Arg( $NO_2$ )-Pro-NHCH<sub>3</sub> gelöst. Die Lösung wird 30 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen, worauf trockener Äther zugesetzt wird. Die gebildete Fällung wird abfiltriert und gut getrocknet. Sie wird dann in 3 Raumteilen DMF gelöst. Während die Lösung gekühlt und gerührt wird, werden 0,05 Raumteile N-Äthylmorpholin zuge tropft.

In dieser Lösung werden 0,19 Gew.-Teile H-(Pyr)Glu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-OH-hydrochlorid gelöst. Zur Lösung werden 0,054 Gew.-Teile HONBI und 0,062 Gew.-Teile DCC gegeben. Das Gemisch wird 2 Stunden bei 0°C und dann über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Der als Nebenprodukt gebildete Harnstoff wird abfiltriert und das DMF abdestilliert. Der Rückstand wird auf eine Säule von Amberlite XAD-2 aufgegeben und in einem Elutionssystem mit linearem Gradienten von 5%igem wässrigem Äthanol bis Äthanol desorbiert. Die Hauptfraktion wird gefriergetrocknet, wobei

0,137 Gew.-Teile reines H-(Pyr)Glu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg(NO<sub>2</sub>)-Pro-NHCH<sub>3</sub> erhalten werden. 0,09 Gew.-Teile dieses Produkts werden mit 4 Gew.-Teilen Fluorwasserstoff in Gegenwart von 0,02 Raumteilen Anisol und 0,02 Raumteilen Mercaptoäthanol 1 Stunde bei 0°C behandelt. Der Fluorwasserstoff wird abdestilliert und der Rückstand nach dem Trocknen in Wasser gelöst. Die Lösung wird durch Amberlite IRA-400 (Acetatform) geleitet und dann an einer Säule von Carboxymethylcellulose adsorbiert. Die Säule wird in einem Elutionssystem mit linearem Gradienten von wässrigem 0,005N Ammoniumacetat bis zu wässrigem 0,2N-Ammoniumacetat eluiert. Die Hauptfraktion wird gefriergetrocknet. Hierbei werden 0,06 Gew.-Teile reines H-(Pyr)-Glu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-NHCH<sub>3</sub> erhalten.  $R_f = 0,37$ ,  $[\alpha]_D^{24} = -55,6^\circ$  (c=0,5 in 5%iger wässriger Essigsäurelösung).

Aminosäureanalyse: His 0,96(1); Arg 0,98(1); Ser 0,96(1); Glu 1,00(1); Pro 1,00(1); Gly 1,00(1); Leu 0,98(1); Tyr 0,98(1); NH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub> 1,12(1). Die Klammerzahlen sind die berechneten Werte.

#### Beispiel 4

Herstellung von H-(Pyr)Glu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Pyrrolidin.

##### a) Herstellung von IBOC-Pro-Pyrrolidin

In 30 Raumteilen Acetonitril werden 11,7 Gew.-Teile IBOC-Pro-OSU und 2,3 Raumteile Pyrrolidin gelöst. Die Lösung wird über Nacht gerührt. Das Acetonitril wird abdestilliert und der Rückstand mit Äthylacetat extrahiert. Der Extrakt wird mit Wasser gewaschen und über wasserfreiem Natriumsulfat dehydratisiert. Das Äthylacetat wird abdestilliert. Die erhaltenen Kristalle werden aus Äthylacetat-Erdölbenzin umkristallisiert. Ausbeute 8,4-Raumteile (80,2%). Schmelzpunkt 84° bis 84,5°C;  $[\alpha]_D^{23} = -83,4^\circ$  (c=1,0, Methanol)

2321174

<u>Elementaranalyse:</u>	<u>C</u>	<u>H</u>	<u>N</u>
Berechnet für $C_{20}H_{32}O_3N_2$ :	68,93	9,26	8,04
Gefunden:	68,93	9,43	8,17

b) Herstellung von IBOC-Arg(NO<sub>2</sub>)-Pro-Pyrrolidin

In 30 Raumteilen Trifluoressigsäure werden 6,96 Gew.-Teile IBOC-Pro-Pyrrolidin gelöst. Die Lösung wird 30 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Zur Lösung wird trockener Äther gegeben. Das erhaltene Öl wird durch Dekantieren isoliert und in einem Exsiccator, der Natriumhydroxyd enthält, getrocknet. Getrennt hiervon werden 7,98 Gew.-Teile IBOC-Arg(NO<sub>2</sub>)-OH in 40 Raumteilen Acetonitril gelöst. Während die Lösung bei 0°C gehalten wird, werden 4,0 Gew.-Teile Dinitrophenol und 4,6 Gew.-Teile DCC zugesetzt, worauf 2 Stunden gerührt wird. Der als Nebenprodukt gebildete Harnstoff wird abfiltriert und das in der oben beschriebenen Weise erhaltene Öl dem Filtrat zugesetzt. Das Gemisch wird auf 0°C gekühlt, worauf 2,5 Raumteile N-Äthylmorpholin zugetropft werden. Das Gemisch wird über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Das Acetonitril wird abdestilliert und der Rückstand an 100 Gew.-Teilen Kieselgel adsorbiert und mit 5%igem wässrigem Methanol desorbiert. Nach dieser Reinigung wird das Lösungsmittel abdestilliert, wobei 6,0 Gew.-Teile eines Pulvers erhalten werden. Ausbeute 54,5%. Schmelzpunkt 190° bis 193°C (Zers.);  $[\alpha]_D^{23} = -59,7^\circ$  (c=1, Methanol)

<u>Elementaranalyse:</u>	<u>C</u>	<u>H</u>	<u>N</u>
Berechnet für $C_{26}H_{43}O_6N_7$ :	56,82	7,88	17,84
Gefunden:	57,00	8,26	17,51

c) Herstellung von IBOC-Leu-Arg(NO<sub>2</sub>)-Pro-Pyrrolidin

In 30 Raumteilen Trifluoressigsäure werden 5,49 Gew.-Teile IBOC-Arg(NO<sub>2</sub>)-Pro-Pyrrolidin gelöst. Die Lösung wird 30 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Dann wird trockener Äther zugesetzt. Die gebildete Fällung wird abfiltriert und gut getrocknet, wobei ein Pulver erhalten wird. Getrennt hiervon werden 3,95 Gew.-Teile IBOC-Leu-OH



2321174

in 20 Raumteilen Dioxan gelöst. Während die Lösung bei 0°C gehalten wird, werden 1,52 Gew.-Teile N-Hydroxy-succinimid und 2,7 Gew.-Teile DCC zugesetzt, worauf das Gemisch 2 Stunden gerührt wird. Der als Nebenprodukt abgeschiedene Harnstoff wird abfiltriert. Zum Filtrat wird das in der oben beschriebenen Weise erhaltene Pulver gegeben, worauf 10 Raumteile Tetrahydrofuran zugesetzt werden. Das Gemisch wird auf 0°C gekühlt, worauf 1,4 Raumteile Triäthylamin zugetropft werden. Das Gemisch wird über Nacht bei Raumtemperatur gerührt, das Lösungsmittel abdestilliert und der Rückstand mit Äthylacetat extrahiert. Der Extrakt wird mit einer 5%igen wässrigen Natriumhydrogencarbonatlösung und einer 10%igen wässrigen Zitronensäurelösung gewaschen. Er wird dann mit Wasser gewaschen und über wasserfreiem Natriumsulfat dehydratisiert. Das Äthylacetat wird abdestilliert und der Rückstand mit Erdölbenzin gewaschen. Der Rückstand wird dann aus Äthylacetat-Erdölbenzin erneut ausgefällt. Ausbeute 5,8 Gew.-Teile; Schmelzpunkt 185° bis 186°C (Zers.);  $[\alpha]_D^{23} = -53,6^\circ$  (c=0,98, Methanol).

Elementaranalyse:

	<u>C</u>	<u>H</u>	<u>N</u>
Berechnet für $C_{32}H_{54}O_7N_8 \cdot H_2O$ :	56,45	8,29	16,46
Gefunden:	56,97	8,17	15,25

d) In 50 Raumteilen Methanol werden 0,22 Gew.-Teile IBOC-Leu-Arg(NO<sub>2</sub>)-Pro-Pyrrolidin gelöst. Die Lösung wird 8 Stunden der Hydrierung in Gegenwart von Palladiumschwarz unterworfen. Das Methanol wird abdestilliert und der Rückstand mit Äther behandelt. Das erhaltene Pulver wird in einem Gemisch von 5 Raumteilen Trifluoressigsäure und 1 Raumteil 2N HCl-Essigsäure gelöst. Die Lösung wird 40 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Die Trifluoressigsäure wird abdestilliert, worauf trockener Äther zugesetzt wird. Die gebildete Fällung wird abfiltriert und gut getrocknet. Dieses Pulver (0,153 Gew.-Teile) wird in 3 Raumteilen DMF zusammen mit 0,24 Gew.-Teilen

309845/1153

2321174

H-(Pyr)Glu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-OH-hydrochlorid gelöst. Zur Lösung werden 0,0742 Gew.-Teile DCC, 0,0644 Gew.-Teile HONBI und 0,084 Raumteile N-Äthylmorpholin gegeben. Das Gemisch wird 5 Stunden bei 0°C und dann über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Der als Nebenprodukt gebildete Harnstoff wird abfiltriert. Zum Filtrat wird Äthylacetat gegeben. Die Fällung wird filtriert und in einer Menge von 0,26 Gew.-Teilen gewonnen. Eine Menge von 0,2 Gew.-Teilen dieses Produkts wird an einer Säule von "Amberlite XAD-2" adsorbiert und in einem Elutionssystem mit linearem Gradienten von 5%igem wässrigem Äthanol (180 Raumteile) bis zu 50%igem wässrigem Äthanol eluiert. Die Fraktionen, die scharf abgegrenzte Zonen bei der Dünnschichtchromatographie (Kieselgel) bilden, werden aufgefangen und gefriergetrocknet. Die Ausbeute beträgt 0,02 Gew.-Teile.  $[\alpha]_D^{21} = -91,0^\circ$  (c=0,5, 5% Essigsäure); Papierchromatographie: Rf=0,72 (n-Butanol-Pyridin-Essigsäure-Wasser = 30:20:6:24). Aminosäureanalyse: His 1,09(1); Arg 0,96(1); Ser 0,82(1); Glu 1,00(1); Pro 0,96(1); Gly 1,00(1); Leu 1,00(1); Tyr 0,96(1).

#### Beispiel 5

Herstellung von H-(Pyr)Glu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-NLe-Arg-Pro-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>

##### a) Herstellung von Z-NLe-Arg(NO<sub>2</sub>)-Pro-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>

In 4 Raumteilen 25% Bromwasserstoffsäure werden 0,4775 Gew.-Teile Z-Arg(NO<sub>2</sub>)-Pro-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub> gelöst. Die Lösung wird 30 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Dann werden 50 Raumteile trockener Äther zum Reaktionsgemisch gegeben. Die abgeschiedene Fällung wird abfiltriert, mit Äther gut gewaschen und über Natriumhydroxyd unter vermindertem Druck getrocknet. Getrennt hiervon werden 0,2653 Gew.-Teile Z-NLe-OH in einem Gemisch von 2 Raumteilen Äthylacetat und 12 Raumteilen Dioxan gelöst. Während die Lösung bei 0°C gehalten wird, werden 0,197

2321174

Gew.-Teile HONBI und 0,226 Gew.-Teile DCC zugesetzt. Das Gemisch wird 3 Stunden gerührt. Der als Nebenprodukt gebildete Harnstoff wird abfiltriert und das Filtrat zu einer Lösung der in der oben beschriebenen Weise erhaltenen Fällung in 1 Raumteil DMF gegeben, worauf 0,28 Raumteile Triäthylamin zugetropft werden. Das Gemisch wird über Nacht gerührt, das Lösungsmittel abdestilliert und der Rückstand mit 100 Raumteilen Chloroform extrahiert. Der Extrakt wird mit 5%iger wässriger Natriumhydrogencarbonatlösung, Wasser, 0,5N Salzsäure und Wasser gewaschen und dann über wasserfreiem Magnesiumsulfat dehydratisiert. Das Chloroform wird abdestilliert und der Rückstand mit Äther behandelt und aus Äthanol-Äther erneut ausgefällt. Die Ausbeute beträgt 0,41 Gew.-Teile. Schmelzpunkt  $109^{\circ}$  bis  $111^{\circ}\text{C}$  (Zers.);  $[\alpha]_D^{22} = -50,4^{\circ}$   $c=0,5$ , Äthanol.

Elementaranalyse:

	<u>C</u>	<u>H</u>	<u>N</u>
Berechnet für $\text{C}_{27}\text{H}_{42}\text{O}_7\text{N}_8 \cdot 0,5\text{H}_2\text{O}$ :	54,07	7,22	18,68
Gefunden:	53,79	7,09	18,24

In 2 Raumteilen 25% Bromwasserstoff-Essigsäure werden 0,155 Gew.-Teile Z-NLe-Arg( $\text{NO}_2$ )-Pro-NH- $\text{CH}_2\text{CH}_3$  gelöst. Die Lösung wird 30 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Dann werden 50 Raumteile trockener Äther zum Reaktionsgemisch gegeben. Die abgeschiedene Fällung wird abfiltriert, mit Äther gut gewaschen und über Natriumhydroxyd unter vermindertem Druck getrocknet.

Die Fällung wird in 2 Raumteilen DMF gelöst. Während die Lösung bei  $0^{\circ}\text{C}$  gehalten wird, werden 0,19 Gew.-Teile H-(Pyr)-Glu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-OH-hydrochlorid, 0,09 Gew.-Teile HONBI, 0,103 Gew.-Teile DCC und 0,1 Raumteil N-Äthylmorpholin in dieser Reihenfolge zugegeben. Das Gemisch wird 5 Stunden bei  $0^{\circ}\text{C}$  und 10 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Der als Nebenprodukt abgeschiedene Harnstoff wird abfiltriert und das DMF unter vermindertem Druck abdestilliert. Der Rückstand wird in 4 Raumteilen

309845/1153

5%igem wässrigem Äthanol zusammen mit 0,2 Gew.-Teilen Harnstoff gelöst. Die Lösung wird an einer Säule von Amberlite XAD-2 adsorbiert und in einem Elutionssystem mit linearem Gradienten von 5%igem wässrigem Äthanol bis 80%igem wässrigem Äthanol desorbiert. Die Hauptfraktion wird gefriergetrocknet, wobei 0,067 Gew.-Teile H-(Pyr)-Glu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-NLe-Arg(NO<sub>2</sub>)-Pro-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub> erhalten werden. Eine Menge von 0,060 Gew.-Teilen dieses Produkts wird in 4 Raumteilen Fluorwasserstoff bei -50°C in Gegenwart von 0,05 Raumteilen Anisol und 0,02 Raumteilen 2-Mercaptoäthanol gelöst. Die Lösung wird 1 Stunde bei 0°C gerührt. Der Fluorwasserstoff wird unter vermindertem Druck abdestilliert und der Rückstand in einem Natriumhydroxyd enthaltenden Exsiccator getrocknet. Der Rückstand wird in 20 Raumteilen Wasser gelöst und die Lösung durch Amberlite CG-400 (Acetatform) geleitet. Der Ablauf wird gefriergetrocknet und auf eine Säule von Carboxymethylcellulose aufgegeben. Er wird in einem Elutionssystem mit linearem Gradienten von 0,005N Ammoniumacetat bis 0,2N Ammoniumacetat desorbiert. Die Hauptfraktion wird gefriergetrocknet, wobei 0,035 Gew.-Teile des gewünschten Produkts erhalten werden. Dieses Produkt wird auf eine Säule von "Sephadex LH-20" aufgegeben und mit 0,1N Essigsäure desorbiert. Die homogene Fraktion wird gefriergetrocknet, wobei 0,028 Gew.-Teile reines H-(Pyr)-Glu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-NLe-Arg-Pro-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub> erhalten werden.

$$[\alpha]_D^{25} = -52,2^\circ \quad (c=0,5, \text{ 5\%ige Essigsäure})$$

Aminosäureanalyse: His 1,00(1); Arg 1,02(1); Trp 1,00(1); Ser 0,91(1); Glu 1,00(1); Pro 1,05(1); Gly 0,98(1); Tyr 1,00(1); NLe 1,02(1).

Beispiel 6

Herstellung von H-(Pyr)Glu-His-Trp-Ser-Phe-Gly-Leu-Arg-  
Pro-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>

a) Herstellung von Z-Ser-Phe-Gly-OEt

2,5 Gew.-Teile Z-Phe-Gly-OEt werden in 50 Raumteilen Methanol gelöst. Die Lösung wird 4 Stunden der katalytischen Reduktion mit 5%iger Palladiumkohle unterworfen. Der Katalysator wird abfiltriert und das Lösungsmittel abdestilliert. Der Rückstand wird in 20 Raumteilen Dimethylformamid gelöst. Zur Lösung werden 2,6 Gew.-Teile Z-Ser-ODNP gegeben. Das Gemisch wird 8 Stunden gerührt. Das Lösungsmittel wird abdestilliert und der Rückstand in Äthylacetat gelöst. Das Lösungsmittel wird mit 5%iger wässriger Natriumhydrogencarbonatlösung, 1N Salzsäure und Wasser gewaschen und dann über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wird abdestilliert und der feste Rückstand aus Äthylacetat-Erdölbenzin kristallisiert. Die Ausbeute beträgt 1,75 Gew.-Teile (74,2%). Schmelzpunkt 128° bis 129°C.  $[\alpha]_D^{22} = -26,6^\circ$  (c=0,6, Äthanol).

<u>Elementaranalyse:</u>	<u>C</u>	<u>H</u>	<u>N</u>
Berechnet für C <sub>24</sub> H <sub>29</sub> O <sub>7</sub> N <sub>3</sub> :	61,13	6,20	8,91
Gefunden:	60,47	6,00	8,88

b) Herstellung von Z-Ser-Phe-Gly-NHNH<sub>2</sub>

1,65 Gew.-Teile Z-Ser-Phe-Gly-OEt werden in 20 Raumteilen Methanol gelöst. Zur Lösung werden 0,71 Raumteile Hydrazinhydrat gegeben. Das Gemisch wird 8 Stunden stehen gelassen. Die gebildeten Kristalle werden abfiltriert und mit Methanol-Äther (1:1) gewaschen. Die Ausbeute beträgt 1,6 Gew.-Teile (100%). Schmelzpunkt 191° bis 193°C.

$[\alpha]_D^{22} = -23,0^\circ$  (c=2, DMF).

<u>Elementaranalyse:</u>	<u>C</u>	<u>H</u>	<u>N</u>
Berechnet für C <sub>22</sub> H <sub>27</sub> N <sub>5</sub> O <sub>6</sub> :	57,76	5,95	15,31
Gefunden:	57,32	6,21	15,53

2321174

c) Herstellung von Z-Ser-Phe-Gly-Leu-Arg(NO<sub>2</sub>)-Pro-NH-  
CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>

0,8 Gew.-Teile Z-Ser-Phe-Gly-NHNH<sub>2</sub> werden in 10 Raumteilen DMF gelöst. Die Lösung wird gekühlt. Dann werden 3,5 Raumteile 2N Salzsäure zugesetzt. Während bei -6°C gerührt wird, wird eine wässrige 2N Natriumnitritlösung zugesetzt. Das Gemisch wird 10 Minuten der Reaktion überlassen. Die Fällung wird durch Zugabe von 10 Raumteilen DMF gelöst. Zum Reaktionsgemisch wird eine gesättigte wässrige Natriumchloridlösung gegeben, worauf mit Äthylacetat extrahiert wird. Der Extrakt wird mit der Waschflüssigkeit zusammengegossen. Die Lösung wird mit 5%iger wässriger Natriumhydrogencarbonatlösung und gesättigter wässriger Natriumchloridlösung gewaschen. Die Äthylacetatschicht (80 Raumteile) wird über Natriumsulfat getrocknet und dann zu 20 Raumteilen einer Lösung von 1,04 Gew.-Teilen H-Leu-Arg(NO<sub>2</sub>)-Pro-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub> in DMF gegeben. Das Äthylacetat wird in ein Eisbad abdestilliert. Die erhaltene homogene Lösung wird 2 Tage bei 3°C gerührt. Das Lösungsmittel wird abdestilliert und der Rückstand durch Chromatographie an Kieselgel gereinigt. Das Chromatogramm wird mit einem Lösungsmittelsystem aus Äthylacetat-Pyridin-Essigsäure-Wasser (60:20:6:10) entwickelt. Die aktiven Fraktionen werden zusammengegossen und zur Entfernung der Lösungsmittel destilliert. Zum Rückstand wird Wasser gegeben. Der gebildete Feststoff wird abfiltriert. Die Ausbeute beträgt 0,87 Gew.-Teile (61,2%). Schmelzpunkt 108°C.  $[\alpha]_D^{22} = -59,1^\circ$  (c=0,7, Äthanol).

Elementaranalyse:

	<u>C</u>	<u>H</u>	<u>N</u>
Berechnet für C <sub>41</sub> H <sub>59</sub> O <sub>11</sub> N <sub>11</sub> ·H <sub>2</sub> O:	54,72	6,83	17,12
Gefunden:	54,95	6,84	16,74

2321174

d) 0,836 Gew.-Teile Z-Ser-Phe-Gly-Leu-Arg(NO<sub>2</sub>)-Pro-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub> werden in Methanol gelöst. Zur Lösung wird 1 Raumteil 1N Salzsäure gegeben. Die Lösung wird der katalytischen Reduktion mit Palladiumschwarz unterworfen. Der Katalysator wird abfiltriert und das Lösungsmittel abdestilliert. Der Rückstand wird in 10 Raumteilen DMF gelöst. In der Lösung werden 0,83 Gew.-Teile H-(Pyr)-Glu-His-Trp-OH und 0,36 Gew.-Teile HONBI gelöst. Das Gemisch wird auf -5°C gekühlt, worauf 0,412 Gew.-Teile DCC zugesetzt werden. Das Gemisch wird 2 Tage der Reaktion überlassen, worauf die Fällung abfiltriert und das DMF abdestilliert wird. Der Rückstand wird durch Chromatographie an einer Säule von Amberlite XAD-2 in einem Elutionssystem mit linearem Gradienten von 5%igem wässrigem Äthanol bis 80%igem wässrigem Äthanol gereinigt. Die aktiven Fraktionen werden zusammengegossen und zur Entfernung des Äthanol destilliert. Die als Rückstand verbleibende wässrige Lösung wird gefriergetrocknet. Das erhaltene Pulver wird durch Ionenaustauschchromatographie an Carboxymethylcellulose in einem Elutionssystem mit linearem Gradienten von 0,005N bis 0,1N wässrigem Ammoniumacetat weiter gereinigt. Die aktive Fraktion wird gefriergetrocknet, wobei ein rein weißes Pulver erhalten wird. Die Ausbeute beträgt 0,424 Gew.-Teile.  $[\alpha]_D^{22} = -55^\circ$  (c=0,5, 5% Essigsäure).

Aminosäureanalyse: His 1,02(1); Arg 1,01(1); Trp 0,91(1); Ser 0,90(1); Glu 1,00(1); Pro 1,00(1); Gly 0,98(1); Leu 1,00(1); Phe 1,00(1); Äthylamin 1,06(1).

Um die Ausbeute an Trp zu ermitteln, werden alle Aminosäureanalysen durch Säurehydrolyse mit 5,7N HCl in Gegenwart von Thioglykolsäure durchgeführt.

309845/1153

2321174

Beispiel 7

Herstellung von H-(Pyr)Glu-His-Trp-Ser-Phe-Gly-Ile-Arg-Pro-NHC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>

a) Herstellung von H-(Pyr)Glu-His-Trp-Ser-Phe-Gly-OtBu

1,57 Gew.-Teile H-Gly-OtBu und 4,0 Gew.-Teile Z-Phe-OSU werden in 20 Raumteilen Äthylacetat gelöst. Das Gemisch wird über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Das Reaktionsgemisch wird mit 5%iger wässriger Natriumhydrogencarbonatlösung, 1N Salzsäure und Wasser gewaschen, über Magnesiumsulfat dehydratisiert und unter vermindertem Druck eingeengt. Zum Rückstand wird Petroläther gegeben. Die Fällung wird abfiltriert, wobei 3,5 Gew.-Teile (85%) Z-Phe-Gly-OtBu vom Schmelzpunkt 78 bis 79°C erhalten werden.  $[\alpha]_D^{23} = -16,7^\circ$  (c=1,0, Äthanol).

Elementaranalyse:

	<u>C</u>	<u>H</u>	<u>N</u>
Berechnet für C <sub>23</sub> H <sub>28</sub> O <sub>5</sub> N <sub>2</sub> :	66,97	6,87	6,79
Gefunden:	67,14	6,64	6,88

7,0 Gew.-Teile Z-Phe-Gly-OtBu werden in 50 Raumteilen Methanol gelöst. Die Lösung wird unter Verwendung von Palladiumschwarz als Katalysator 5 Stunden reduziert. Das Reaktionsgemisch wird filtriert und das Filtrat durch Abdampfen des Lösungsmittels eingeengt. Der Rückstand wird in 10 Raumteilen Acetonitril gelöst. Zur Lösung werden 1,62 Gew.-Teile Z-Ser-ODNP gegeben. Das erhaltene Gemisch wird 1 Tag bei Raumtemperatur gerührt, worauf das Acetonitril abgedampft wird. Der Rückstand wird in Äthylacetat gelöst. Die Lösung wird mit 10%igem wässrigem Ammoniak, 1N Salzsäure und Wasser gewaschen, über wasserfreiem Magnesiumsulfat dehydratisiert und durch Abdampfen des Lösungsmittels eingeengt. Der Rückstand wird in Petroläther aufgenommen und aus Äthylacetat-Petroläther umkristallisiert, wobei 1,41 Gew.-Teile (70%) Z-Ser-Phe-Gly-OtBu vom Schmelzpunkt 105° bis 106°C erhalten werden.

309845/1153



$$[\alpha]_D^{23} = -26,6^\circ \text{ (c=0,74, Äthanol).}$$

2321174

Elementaranalyse:

	<u>C</u>	<u>H</u>	<u>N</u>
Berechnet für $C_{26}H_{33}O_7N_3$ :	62,50	6,66	8,41
Gefunden:	62,91	6,38	8,12

1,34 Gew.-Teile Z-Ser-Phe-Gly-OtBu werden in 50 Raumteilen Methanol gelöst. Die Lösung wird 5 Stunden der katalytischen Reduktion unter Verwendung von Palladiumschwarz als Katalysator unterworfen. Das Gemisch wird filtriert und das Filtrat eingeeengt. Der Rückstand sowie 1,27 Gew.-Teile H-(Pyr)Glu-His-Trp-OH und 0,83 Gew.-Teile HONBI werden in 20 Raumteilen DMF gelöst. Die Lösung wird mit Eis gekühlt. Nach Zugabe von 0,95 Gew.-Teilen DCC wird das Gemisch über Nacht der Reaktion überlassen. Die Fällung wird abfiltriert und das Filtrat eingeeengt. Nach Zugabe von Acetonitril zum Rückstand wird das Gemisch erhitzt. Das abgeschiedene Pulver wird vom Gemisch abfiltriert und aus 50%igem wässrigem Äthanol erneut ausgefällt, wobei 1,8 Gew.-Teile (87%) H-(Pyr)Glu-His-Trp-Ser-Phe-Gly-OtBu erhalten werden.  $[\alpha]_D^{23} = -20,6^\circ$  (c=1,0, DMF).

Elementaranalyse:

	<u>C</u>	<u>H</u>	<u>N</u>
Berechnet für $C_{40}H_{49}O_9N_9 \cdot 2H_2O$ :	58,59	6,52	15,38
Gefunden:	59,02	6,62	15,23

b) Herstellung von Z-Ile-Arg(NO<sub>2</sub>)-Pro-NHC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>

1,43 Gew.-Teile Z-Arg(NO<sub>2</sub>)-Pro-NHC<sub>2</sub>H<sub>5</sub> werden in 10 Raumteilen 25% HBr-Essigsäure gelöst. Das Gemisch wird 40 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Dann werden 80 Raumteile trockener Äther zugesetzt. Die gebildete Fällung wird abfiltriert und getrocknet, wobei ein Pulver erhalten wird.

0,795 Gew.-Teile Z-Ile-OH werden in 10 Raumteilen Dioxan gelöst. Die Lösung wird auf 0°C gekühlt. Nach Zugabe von 0,59 Gew.-Teilen HONBI und 0,68 Gew.-Teilen DCC zur Lösung wird das Gemisch 2 Stunden gerührt. Das Gemisch wird zur Entfernung der Fällung filtriert. Zum Filtrat

309845/1153

2321174

wird das in der oben beschriebenen Weise hergestellte Pulver gegeben. Nach Zusatz von 0,84 Raumteilen Triäthylamin wird das Gemisch 12 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Das als Lösungsmittel verwendete Dioxan wird abgedampft. Der Rückstand wird in 100 Raumteilen Chloroform gelöst und die Lösung mit 0,1N Salzsäure, 5%iger wässriger Natriumhydrogencarbonatlösung und Wasser gewaschen, über wasserfreiem Magnesiumsulfat getrocknet und durch Abdampfen des Chloroforms eingeeengt. Der Rückstand wird mit Äther verrieben, wobei eine Fällung gebildet wird, die aus Äthanol-Äther erneut ausgefällt wird, wobei 1,1 Gew.-Teile Z-Ile-Arg(NO<sub>2</sub>)-Pro-NHC<sub>2</sub>H<sub>5</sub> vom Schmelzpunkt 103° bis 105°C (Zers.) erhalten werden.  $[\alpha]_D^{23} = -58,1^{\circ}$  (c=1, Methanol).

Elementaranalyse:

	<u>C</u>	<u>H</u>	<u>N</u>
Berechnet für C <sub>27</sub> H <sub>42</sub> O <sub>7</sub> N <sub>8</sub> ·0,5H <sub>2</sub> O:	54,08	7,23	18,68
Gefunden:	53,80	7,15	18,84

c) 0,177 Gew.-Teile Z-Ile-Arg(NO<sub>2</sub>)-Pro-NHC<sub>2</sub>H<sub>5</sub> werden in 3 Raumteilen 25% HBr-Essigsäure gelöst. Die Lösung wird 30 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen und dann mit 50 Raumteilen trockenem Äther versetzt. Die Fällung wird abfiltriert, mit Äther gut gewaschen und getrocknet, wobei eine Aminkomponente erhalten wird.

0,221 Gew.-Teile H-(Pyr)-Glu-His-Trp-Ser-Phe-Gly-OtBu werden in 5 Raumteilen Trifluoressigsäure gelöst. Die Lösung wird 40 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen und dann mit 0,05 Raumteilen 5,7N Salzsäure und anschließend mit 50 Raumteilen Äther versetzt. Die Fällung wird abfiltriert, getrocknet und in 3 Raumteilen DMF gelöst. Die Lösung wird auf 0°C gekühlt und dann mit der in der oben beschriebenen Weise hergestellten Aminkomponente, 0,097 Gew.-Teilen HONBI, 0,111 Gew.-Teilen DCC und 0,126 Raumteilen Triäthylamin versetzt. Das erhaltene Gemisch wird 5 Stunden bei 0°C und dann 10 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Das Gemisch wird zur Entfernung des hierbei

2321174

gebildeten Dicyclohexylharnstoffs filtriert. Das Filtrat wird unter vermindertem Druck eingeeengt. Der Rückstand wird in 10 Raumteilen 10%igem wässrigem Äthanol gelöst. Die Lösung wird oben auf eine Säule von Amberlite XAD-2 aufgegeben. Die Desorbition wird in einem Elutionssystem mit linearem Gradienten von 10%igem bis 80%igem wässrigem Äthanol durchgeführt. Die das Produkt enthaltenden Fraktionen werden aufgefangen, durch Abdampfen des als Lösungsmittel verwendeten Äthanol eingeeengt und gefriergetrocknet, wobei 0,085 Gew.-Teile H-(Pyr)Glu-His-Trp-Ser-Phe-Gly-Ile-Arg(NO<sub>2</sub>)-Pro.NHC<sub>2</sub>H<sub>5</sub> erhalten werden.

0,07 Gew.-Teile des Produkts werden in einem Gemisch von 0,02 Raumteilen Anisol, 0,02 Raumteilen 2-Mercaptoäthanol und 4 Raumteilen wasserfreiem Fluorwasserstoff gelöst. Die Lösung wird 1 Stunde bei 0°C gerührt, worauf der Fluorwasserstoff unter vermindertem Druck abgedampft wird. Der Rückstand wird im Exsiccator getrocknet, in 50 Raumteilen Wasser gelöst und durch eine Säule von Amberlite IRA-400 (Acetatform) geleitet. Die von der Säule ablaufende Lösung wird gefriergetrocknet, wobei 0,075 Gew.-Teile rohes Produkt erhalten werden. Dieses Produkt wird an einer Säule von Carboxymethylcellulose adsorbiert und in einem Elutionssystem mit linearen Gradienten von 0,005N Ammoniumacetat bis 0,2N Ammoniumacetat desorbiert. Die das gewünschte Produkt enthaltenden Fraktionen werden gefriergetrocknet. Das hierbei erhaltene Produkt wird in wässriger 0,1N-Essigsäurelösung gelöst. Die Lösung wird durch eine Säule von Sephadex LH-20 geleitet. Die von der Säule ablaufende Lösung wird gefriergetrocknet, wobei 0,043 Gew.-Teile reines Produkt erhalten werden.  $R_f \ 3 = 0,41$ .  $[\alpha]_D^{23} = -59,4^\circ$  (c=0,5, 5% Essigsäure).

Aminosäureanalyse: His 1,1(1); Arg 1,1(1); Trp 0,87(1); Äthylamin 1,0(1); Ser 0,81(1); Glu 1,03(1); Pro 1,0(1); Gly 1,0(1); Ile 1,06(1); Phe 0,97(1). Die Klammerzahlen sind die theoretischen Werte.

309845/1153

2321174

Beispiel 8

Herstellung von H-(Pyr)Glu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Met-Arg-Pro-NHC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>

a) Herstellung von BOC-Met-Arg-Pro-NHC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>

1,91 Gew.-Teile Z-Arg(NO<sub>2</sub>)-Pro-NHC<sub>2</sub>H<sub>5</sub> werden in 10 Raumteilen 25% HBr-Essigsäure gelöst. Die Lösung wird 30 Minuten stehen gelassen und dann mit trockenem Äther versetzt. Die Fällung wird abfiltriert, mit Äther gut gewaschen und getrocknet, wobei eine Aminkomponente erhalten wird.

1,75 Gew.-Teile BOC-Met-OH.DCHA werden in 100 Raumteilen Äther gelöst. Die Lösung wird zweimal mit 50 Raumteilen einer wässrigen 0,2N Schwefelsäurelösung gewaschen und über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet. Der Äther wird abgedampft und der Rückstand in 20 Raumteilen Dioxan gelöst. Die Lösung wird auf 0°C gekühlt und mit 0,905 Gew.-Teilen DCC und 0,79 Gew.-Teilen HONBI versetzt. Das Gemisch wird 2 Stunden gerührt. Der gebildete Dicyclohexylharnstoff wird abfiltriert und das Filtrat eingeeengt. Zum Rückstand werden 5 Raumteile DMF und die gesamte Menge der in der oben beschriebenen Weise hergestellten Aminkomponente gegeben. Die erhaltene Lösung wird gekühlt und dann mit 1,12 Raumteilen Triäthylamin versetzt. Das Gemisch wird 12 Stunden bei Raumtemperatur gerührt und das DMF abgedampft. Der Rückstand wird in 100 Raumteilen Chloroform gelöst, <sup>mit</sup> 0,1N Salzsäure, 5%iger wässriger Natriumhydrogencarbonatlösung und Wasser gewaschen, über wasserfreiem Magnesiumsulfat getrocknet und durch Abdampfen des Chloroforms eingeeengt. Durch Zugabe von Äther zum Rückstand wird ein Feststoff gebildet. Dieser Feststoff wird aus Äthylacetat-Äther erneut ausgefällt, wobei 1,4 Gew.-Teile BOC-Met-Arg-Pro-NHC<sub>2</sub>H<sub>5</sub> vom Schmelzpunkt 101 bis 104°C (Zers.) erhalten werden.  $[\alpha]_D^{22} = -64,4^\circ$  (c=1,0, Methanol).

309845/1153

2321174

Elementaranalyse:

Berechnet für

 $C_{23}H_{42}O_7N_8S \cdot 0,5 H_2O$ :

Gefunden:

CHNS

47,33

7,42

19,20

5,49

47,67

7,23

18,94

5,48

b) H-(Pyr)Glu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Met-Arg-Pro-NHC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>

0,275 Gew.-Teile BOC-Met-Arg(NO<sub>2</sub>)-Pro-NHC<sub>2</sub>H<sub>5</sub> werden in einem Gemisch von 0,1 Raumteilen 2-Mercaptoäthanol und 5 Raumteilen Trifluoressigsäure gelöst. Die Lösung wird 30 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen und dann mit 0,085 Raumteilen 5,7N Salzsäure versetzt. Das Gemisch wird gekühlt und mit 50 Raumteilen Äther versetzt. Die Fällung wird abfiltriert, mit Äther gewaschen, getrocknet, in DMF gelöst und auf 0°C gekühlt. Zur Lösung werden 0,318 Gew.-Teile H-(Pyr)Glu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-OH-hydrochlorid, 0,107 Gew.-Teile HONBI, 0,124 Gew.-Teile DCC und 0,17 Raumteile N-Äthylmorpholin gegeben. Das Gemisch wird 12 Stunden gerührt. Der ausgefällte Dicyclohexylharnstoff wird abfiltriert und das Filtrat unter vermindertem Druck eingeeengt. Der Rückstand wird in 5 Raumteilen 5%igem wässrigem Äthanol gelöst. Die Lösung wird auf eine Säule von Amberlite XAD-2 aufgegeben und in einem Elutionssystem mit linearem Gradienten von 5%igem bis 80%igem wässrigem Äthanol desorbiert. Die Hauptfraktionen werden gefriergetrocknet und getrocknet, wobei 0,135 Gew.-Teile H-(Pyr)Glu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Met-Arg-(NO<sub>2</sub>)-Pro-NHC<sub>2</sub>H<sub>5</sub> erhalten werden. 0,1 Gew.-Teile dieses Produkts werden in einem Gemisch von 0,02 Raumteilen Anisol, 0,02 Raumteilen Äthanol, 0,02 Raumteilen 2-Mercaptoäthanol und 6 Raumteilen Fluorwasserstoff gelöst. Die Lösung wird 1 Stunde bei 0°C gerührt. Der Fluorwasserstoff wird unter vermindertem Druck abgedampft und der Rückstand im Exsiccator getrocknet. Der Rückstand wird in 20 Raumteilen Wasser gelöst und durch eine Säule von Amberlite CG-400 (Acetatform) geleitet. Die aus der Säule ablaufende Lösung wird gefriergetrocknet. Der Rückstand

309845/1153

wird in 20 Raumteilen Wasser gelöst. Zur Lösung werden 0,4 Raumteile Thioglykolsäure gegeben. Das Gemisch wird 10 Stunden bei 60°C stehen gelassen. Das Reaktionsgemisch wird mit 50 Raumteilen Wasser verdünnt, an einer Säule von Carboxymethylcellulose adsorbiert und in einem Elutionssystem von 0,005N bis 0,2N Ammoniumacetat desorbiert. Die Hauptfraktionen werden gefriergetrocknet, wobei 0,02 Gew.-Teile des rohen gewünschten Produkts erhalten werden. Das Produkt wird an einer Säule von Sephadex LH-20 adsorbiert und mit 0,1N Essigsäure eluiert. Die eluierte Lösung wird gefriergetrocknet, wobei das gereinigte Produkt erhalten wird. Dünnschichtchromatographie:  $R_f = 0,31$  (Kieselgel; n-Butanol:Essigsäure:Äthylacetat:Wasser = 1:1:1:1).

$[\alpha]_D^{23} = -43,2^\circ$  (c=25,5, 5% Essigsäure).  
Arg 0,9(1);

Aminosäureanalyse: His 0,9(1); Trp 0,8(1); Ser 0,7(1), Glu 0,9(1); Pro 1,1(1); Gly 1,0(1); Met 0,9(1); Tyr 0,7(1); Äthylamin 0,9(1). Die Klammerzahlen sind die theoretischen Werte.

#### Versuch

Die Nonapeptidamidderivate gemäß der Erfindung wurden Ratten im Diöstrus subkutan verabreicht und auf ihre ovulationsinduzierende Wirkung untersucht. Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle genannt.

2321174

Ovulationsinduzierende Wirkung bei Ratten im Diöstrus

A <sub>1</sub>	A <sub>2</sub>	Y	ED <sub>50</sub> (ng/100 g Körpergewicht)
Tyr	Leu	NH-CH <sub>3</sub>	165,0
Tyr	Leu	NH-CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub>	32,0
Tyr	Leu	NH-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub>	56,0
Tyr	Leu	NH-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -OH	170,0
Tyr	Leu	NH-CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	76,0
Tyr	Nle	NH-CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub>	53,6
Tyr	Met	NH-CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub>	35,0
Phe	Leu	NH-CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub>	84,0
Phe	Ile	NH-CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub>	115,0

Tyr	Leu	Gly-NH <sub>2</sub>	215 ± 12 ng
-----	-----	---------------------	-------------

Natürliches Decapeptid.

P a t e n t a n s p r ü c h e

1) Nonapeptidamidderivate der allgemeinen Formel

L-Pyroglutamyl-L-Histidyl-L-Tryptophyl-L-Seryl-A<sub>1</sub>-  
Glycyl-A<sub>2</sub>-L-Arginyl-L-Prolin-Y

in der A<sub>1</sub> für L-Tyrosyl oder L-Phenylalanyl, A<sub>2</sub> für L-Leucyl, L-Isoleucyl, L-Norleucyl, L-Valyl, L-Norvalyl, L-Methionyl oder L-Phenylalanyl und Y für NHR steht, worin R ein gegebenenfalls mit einer Hydroxylgruppe substituierter geradkettiger oder verzweigter Alkylrest mit 1 bis 3 C-Atomen oder eine Pyrrolidinogruppe ist, und pharmazeutisch unbedenkliche Salze dieser Nonapeptidamidderivate.

- 2) Nonapeptidamidderivat nach Anspruch 1 mit der dort genannte Formel, in der A<sub>1</sub> für L-Tyrosyl, A<sub>2</sub> für L-Leucyl und Y für NHCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub> steht.
- 3) Nonapeptidamidderivat nach Anspruch 1 mit der dort genannten Formel, in der A<sub>1</sub> für L-Tyrosyl, A<sub>2</sub> für L-Leucyl und Y für NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH steht.
- 4) Nonapeptidamidderivat nach Anspruch 1 mit der dort genannten Formel, in der A<sub>1</sub> für L-Tyrosyl, A<sub>2</sub> für L-Leucyl und Y für NHCH<sub>3</sub> steht.
- 5) Nonapeptidamidderivat nach Anspruch 1 mit der dort genannten Formel, in der A<sub>1</sub> für L-Phenylalanyl, A<sub>2</sub> für L-Isoleucyl und Y für NHCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub> steht.
- 6) Nonapeptidamidderivat nach Anspruch 1 mit der dort genannten Formel, in der A<sub>1</sub> für L-Tyrosyl, A<sub>2</sub> für L-Leucyl und Y für eine Pyrrolidinogruppe steht.
- 7) Nonapeptidamidderivat nach Anspruch 1 mit der dort genannten Formel, in der A<sub>1</sub> für L-Tyrosyl, A<sub>2</sub> für L-Leucyl und Y für N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> steht.



2321174

- 8) Nonapeptidamidderivat nach Anspruch 1 mit der dort genannten Formel, in der  $A_1$  für L-Tyrosyl,  $A_2$  für L-Leucyl und Y für  $\text{NHCH}(\text{CH}_3)_2$  steht.
- 9) Nonapeptidamidderivat nach Anspruch 1 mit der dort genannten Formel, in der  $A_1$  für L-Tyrosyl,  $A_2$  für L-Norleucyl und Y für  $\text{NHCH}_2\text{CH}_3$  steht.
- 10) Nonapeptidamidderivat nach Anspruch 1 mit der dort genannten Formel, in der  $A_1$  für L-Tyrosyl,  $A_2$  für L-Methionyl und Y für  $\text{NHCH}_2\text{CH}_3$  steht.
- 11) Nonapeptidamidderivat nach Anspruch 1 mit der dort genannten Formel, in der  $A_1$  für L-Phenylalanyl,  $A_2$  für L-Leucyl und Y für  $\text{NHCH}_2\text{CH}_3$  steht.
- 12) Verfahren zur Herstellung von Nonapeptidamidderivaten nach den Ansprüchen 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß man ein Reagens (A), nämlich L-Pyroglutaminsäure oder ein Peptidfragment, das eine L-Pyroglutaminsäureeinheit an seinem N-endständigen Teil enthält und anschließend daran aus der oben genannten Aminosäuresequenz besteht, mit einem Reagens (B), nämlich einer Aminkomponente, die dem restlichen Teil des oben genannten, als Produkt <sup>kondensiert</sup> gewünschten Nonapeptidamidderivats entspricht, wobei die beiden Reagentien (A) und (B) wahlweise durch eine oder mehrere Schutzgruppen geschützt sein können, und die gegebenenfalls vorhandenen Schutzgruppen entfernt.

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☒ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:**

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**